

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-519238

(P2004-519238A)

(43) 公表日 平成16年7月2日(2004.7.2)

(51) Int. Cl.⁷

A23L 1/105

A23L 1/10

A23L 1/30

F I

A23L 1/105

A23L 1/10

A23L 1/30

テーマコード (参考)

4B018

4B023

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願2002-568932 (P2002-568932)
(86) (22) 出願日 平成14年2月28日 (2002.2.28)
(85) 翻訳文提出日 平成15年8月28日 (2003.8.28)
(86) 国際出願番号 PCT/SE2002/000357
(87) 国際公開番号 W02002/069738
(87) 国際公開日 平成14年9月12日 (2002.9.12)
(31) 優先権主張番号 0100704-6
(32) 優先日 平成13年3月1日 (2001.3.1)
(33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 503313199
オリゴン・アクチボラゲット
O L L I G O N A B
スウェーデン、エス-756 51ウブサ
ラ、ウルトゥナアレン2ペー番
(74) 代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(74) 代理人 100106518
弁理士 松谷 道子
(74) 代理人 100116311
弁理士 元山 忠行
(74) 代理人 100122301
弁理士 富田 憲史
(74) 代理人 100127638
弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵穀物食品の生産方法およびその生産物

(57) 【要約】

発酵食品の生産の改良方法、特に原料として全粒穀物を用いたテンペ型の発酵穀物生産物の製造の改良方法により、良好な微生物上、栄養上、および感覚上の特性の生産物を得ることが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

表面の変質が最小化された全粒穀物原料からの発酵食品の製造方法であって、以下の工程、

- －水溶液に全粒穀物原料を浸漬する工程、
- －水性媒体中で全粒穀物原料を加熱処理する工程、
- －全粒穀物原料を酸性化させる工程、
- －クモノスカビ属の菌を接種する工程、および、
- －接種された全粒穀物原料をインキュベーションする工程、を含む方法。

10

【請求項2】

酸性化が穀物原料の浸漬に用いる水溶液への有機酸の添加からなることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

酸性化が、酢酸産生細菌、乳酸産生細菌およびプロピオン酸産生細菌からなる群から選択される酸産生細菌の添加からなることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

穀物原料の浸漬に用いられる水溶液の初期pHが約pH2.5であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】

浸漬時間が約4時間から約8時間の間であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

20

【請求項6】

加熱処理時間が約5分から約10分の間であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項7】

穀物原料が実質的に全粒の形態の大麦 (*Hordeum vulgare*) から構成されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項8】

クモノスカビ属の菌がリゾプス・オリゴスポルス (*Rhizopus oligosporus*) であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項9】

クモノスカビ属の菌がリゾプス・オリゴスポルス (*Rhizopus oligosporus*) 分離株である J189 (NRRL 2710)、J373 (CBS 337.62)、および J401 (ATTC 64063) から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

30

【請求項10】

クモノスカビ属の菌がリゾプス・オリゴスポルス (*Rhizopus oligosporus*) 分離株 J401 (ATTC 64063) であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項11】

インキュベーションを30℃から37℃の間の温度で行うことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項12】

接種された全粒穀物原料が発酵前に冷凍保存および解凍されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

40

【請求項13】

発酵生産物がインキュベーションの完了後に水溶液中で煮沸または湯通しされることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項14】

発酵生産物がインキュベーションの完了後に冷凍保存されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項15】

インキュベートした生産物の煮沸または湯通しに用いられる水溶液に着色剤および香味料

50

を添加することを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

全粒穀物およびクモノスカビ属の菌を含む発酵食品。

【請求項 17】

全粒穀物が主に大麦 (*Hordeum vulgare*) によって構成されることを特徴とする請求項 16 に記載の発酵食品。

【請求項 18】

クモノスカビ属の菌が、リゾプス・オリゴスポルス分離株である J189 (NRRL 2710)、J373 (CBS 337.62)、および J401 (ATTC 64063) から選択されることを特徴とする請求項 16 に記載の発酵食品。

【請求項 19】

クモノスカビ属の菌が、リゾプス・オリゴスポルス分離株 J401 (ATTC 64063) であることを特徴とする請求項 18 に記載の発酵食品。

【請求項 20】

穀物中のフィチン酸含量が非処理穀物のフィチン酸含量と比較して少なくとも 70% 減少していることを特徴とする、全粒穀物およびクモノスカビ属の菌を含む発酵食品。

【請求項 21】

請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載の方法によって生産された発酵食品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は人の食用の発酵食品、特にクモノスカビ (*Rhizopus*) 属のカビを用いた全粒穀物からの発酵穀物食品の製造の改良方法に関する。

【背景技術】

【0002】

世界の人口は増えつつあり、食料供給はますます重要になっている。さらに食料の生産は、特に動物性タンパク質の生産からの廃棄物など、環境にかなりの悪影響を及ぼしている。食料を動物源から生産する場合、穀物からの場合と比較してエネルギーの損失も高い。増加しつつある人口を養うために世界の各国は食料として潜在的に好適なすべての原料の現在の利用を見直し、現存する動物用飼料のより多くを人間用食品へと変換しなければならない。

【0003】

菜食の市場は加速的に成長しており、植物食料を動物源からの食料の代わりとしてあるいは補助的に用いることへの関心が広がりつつある。これはとりわけ最近取り入れられた菌タンパク質 (*mycoprotein*) 産物に見られる商業的成功によって例証される。本発明の目的の 1 つは発酵穀物生産物の製造の改良方法を提供することである。

【0004】

インドネシアにおいて、肉の代替として、菌類による発酵によって生産されるダイズ生産物であるテンペ (*tempeh* (*tempe*)) がよく用いられている。テンペはインゲンマメ、エンドウマメ、小麦などの他の原料から製造することもできる。インドネシアではテンペは家庭で小規模生産されていることが多いが、オランダ、日本および米国ではダイズテンペの大規模生産が行われている。しかしテンペの生産では微生物の混入や品質の変動が起こりやすい。したがって本発明のもう 1 つの目的はテンペ型の発酵食品の製造の改良方法を提供することである。

【0005】

穀物 (小麦、大麦、ライ麦、オート麦) は非常に良好な栄養上の特性を有する。穀物は動物飼料としてよく用いられる。小麦およびオート麦は例えば朝食用シリアルを製造するためにも用いられ、小麦粉はパン菓子およびパンに用いられる。大麦は主にビールの製造に用いられる。ライ麦は主にパンの製造に用いられる。本発明の目的の 1 つは穀物の高価値の特性により消費者に利益を与えるため、人間の食料における穀物の使用を増加させるため

に新規な穀物からの生産物を提供することである。別の目的は、ミネラルの有効性の改良、ビタミン状態の改良などの良好な栄養上の価値を示し、低い糖血症指標を維持した穀物からの生産物を生産することである。

【0006】

大麦 (*Hordeum vulgare*) は非常に良好な栄養特性を有するが、現在は主に動物飼料として用いられている。人の食用の大麦からの生産物を構成するものの中ではビールが最大である。しかしビールにおいては大麦の高価値の特性のすべてが消費者に恩恵を与えているわけではない。したがって本発明の目的の1つは、人間用の食料における大麦の利用を増加させるために、大麦からの新規な生産物を提供することである。別の目的は、人の食用の大麦からの生産物を生産することであり、ここで該生産物はミネラル有効性の改良などの良好な栄養上の価値および糖血症指標の改善を示すものである。

10

【従来技術】

【0007】

30年以上前、Hesseltine ら (New fermented cereal products, Dev. Ind. Microbiol., 1967, 8, 179-186) は、インドネシアのテンペ発酵から得られたリゾプス (クモノスカビ属) ・オリゴスポルス (*Rhizopus oligosporu*) の選抜株を用いて、小麦、オート麦、ライ麦、大麦、米、および、米または小麦とダイズとの組合せから、発酵テンペ型生産物を作ることができることを示した。皮をむいた種子の挽き割がカビの良好な成長に必須であることが見出された。皮をむいて挽き割にした種子の形態で大麦についても試したところ、発酵の前に12分間の煮沸期間が必要であることが見出された。Hesseltine らの実験はクモノスカビ属 (*Rhizopus*) の特定の株だけが利用できることを示すものであった。高活性のタンパク分解および脂質分解酵素系を有するがアミラーゼ活性をほとんどまたは全く有さない株が、皮をむいて挽き割にした穀物からの穀物テンペの生産に最適であることが判明した。

20

【0008】

J P 5 8 1 5 8 1 4 8 A (1982年3月15日のJ P 1 9 8 2 0 0 3 9 4 1 3号) には、豆類、穀類およびナッツ類を挽く、発酵食品の生産方法が開示されている。水を添加した結果生じるどろどろしたものを予備発酵させ、その後それを加熱して酸の添加によりpHを4.0~7.0に調整する。次いで水分含量が30~65%に達するまで水分を除去し、リゾプス・オリゴスポルス (*Rhizopus oligosporus*) 種に属する微生物を添加し、どろどろしたものを28~34℃で発酵させる。この生産物は西洋風の料理に有用であり、冷凍状態で保存できると主張されている。

30

【0009】

より最近ではNowak (*Acta Biotechnol.*, 12 (1992) 4, 345-348) などにより、穀物テンペの生産に関する問題がいくつか挙げられており、よいテンペを生産するために穀物と豆類とを混合することが推奨されている。

【0010】

Hachmeister および Fung (*Critical Reviews in Microbiology*, 19(3):137-188 (1993)) の幅広い概説記事によると、テンペの生産のための様々な穀物の使用が評価されている。大麦、小麦および米から作られたテンペは非常に良好な風味、食感および香りを有することが示されている。Hachmeister および Fung は、望ましくない微生物の成長を阻害するために酸により前処理する可能性について議論している。しかしこれはダイズにのみ適用されたようであり、Hachmeister および Fung は原料として小麦を用いる場合は酸処理は必要でないと述べており、穀物原料の酸処理は不必要であることを示している。しかし本発明者らの知るところによると、穀物からの生産物は市場性に達していないようであり、これは関連する実際的な問題が克服されていないことを示している。

40

【0011】

上記概説において著者である Hachmeister および Fung は挽く工程を用いない全粒小麦を使用する従来を試みによっては、カビの成長が不良であると述べている。また、モロコシ、小麦およびライコムギを含む全粒から作られるテンペのパテは堅さに欠け、スライス

50

に向かないことも判明している。

【0012】

人の食用の新規な発酵穀物生産物を開発するにあたっては、健康上および安全上の局面を重視すべきである。他に考慮すべき問題としては、栄養素の有効性などの生産物の栄養上の価値、糖血症指標、微生物含量、風味、食感、および生産物の全体の外観などが挙げられる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の具体的目的は、従来は不可能であると考えられていた特性である、穀物の構造上の堅さを保つことを可能にすることである。もしこれが達成されると、特に栄養上の観点から非常に有益である。工程の安定性および制御可能性、その経済的採算性およびその他の実際的なまたは経済的問題も考慮することが必要である。

【課題を解決するための手段】

【0014】

(発明の概要)

本発明は、クモノスカビ（リゾプス；Rhizopus）属のカビを用いた全粒穀物からの発酵穀物生産物、特にこのタイプの新規な大麦からの生産物の製造の新規な改良方法を提供する。引用によりこの明細書に含まれる特許請求の範囲において特定された改良方法を行うことにより、本発明者らは、クモノスカビ（Rhizopus）の胞子形成を回避するかあるいは最小化しつつ、快い風味および食感、良好な外観、そして微生物上の安全性および安定性を備えた、全粒からの発酵穀物生産物、特に大麦からの発酵生産物を生産した。さらに最終生産物は均質であり、本発明の工程は良好な再現性および信頼性を示した。

【0015】

(説明)

大麦（*Hordeum vulgare* L.）はスウェーデンの主要作物の1つである。成長期はきわめて短く、乾燥、冠水および霜に対する耐性は良好である。大麦は約8000年間栽培されており、すべての古くからの文化圏で知られている。

【0016】

大麦穀粒は外皮を備えたままで収穫される。外皮は粉殻と外花穎から構成され、果皮（皮）に強固に結合している。穀果は、果皮、種皮、胚および内胚乳から構成される。大麦の糊粉層は多層であり、内胚乳細胞にはタンパク質マトリックスに組み込まれたデンプンが満たされている。

【0017】

大麦を人の食用に精製する際、殻は脱外皮工程により除かれる。次いで穀粒は精麦として知られる工程において研磨され、胚と糊粉層が除かれる。精麦の程度を変えることにより灰含量が変化する。脱外皮された大麦はまた、穀粒を切断して便宜の大きさにすることにより大麦小粒へと処理され得る。

【0018】

ここで「全粒」とは、少なくとも部分的に胚および糊粉層が除かれている（適用できる場合）が、種子の基本的な外形および構造的堅さが維持された粒状物を意味する。「全粒」とはまた、胚および糊粉層が除去されている（適用できる場合）ことを除いては、実質的に植物学的に無処置の粒状物としても定義される。

【0019】

「裸麦」として知られる品種では、外皮が事実上存在せず、脱外皮工程および研磨工程を避けることができる。したがって、ミネラル、ビタミンおよび重要な食物繊維成分が失われる可能性を避けることができる。しかし種子が微生物を含む危険性が増加する。微生物の量は通常脱外皮工程および研磨工程において減少する。これらの品種はそのまま用いる場合または軽く前処理した後に用いる場合も「全粒穀物」の定義に含まれる。

【0020】

10

20

30

40

大麦の組成は環境および遺伝子型によって変動する。大麦穀粒の主要な化学的構成物質はデンプンであり、その量はタンパク質のパーセンテージに反比例する。デンプン含量は53～67%の間である。大麦デンプンのアミロペクチン含量は約74～78%であり、残りの約22～26%がアミロースである。タンパク質含量は一般に9～14%である。

【0021】

精白大麦の食物繊維含量はおよそ16%であり、その主な構成成分は、セルロース、キシラン構造、リグニンおよびβ-グルカンである。食物繊維は人間用食物において非常に重要である。というのは一般的見解として繊維の摂取は、血中コレステロールレベルの低下など、生理的に良好な効果を有するからである。大麦はかなり多くの量のβ-グルカンを含んでおり、内胚乳細胞壁の構成物のおよそ75%の割合を占める。細胞壁においてβ-グルカンはタンパク質に結合し、タンパク分解酵素およびデンプン分解酵素の作用に対する障壁を形成する。

10

【0022】

テンペの伝統的な原料であるダイズと大麦の間の相違がかなりのものであることは当業者には明白であろう。ダイズの主な構成成分はタンパク質であるのに対し、大麦の主な構成成分はデンプンである。それゆえこれらの物質上で同様に菌類が成長することは予測されない。したがって本発明者らは穀物テンペの産生に用いた場合、リゾプス・オリゴスポルス (*R. oligosporu*) の様々な分離株の間に機能において大きな相違があることを見出した。

【0023】

本発明者らは全粒からの発酵穀物生産物、特にテンペ型の大麦からの発酵生産物の製造の改良方法を提供する。

20

【0024】

該方法および生産物についての具体的な目的を表1に挙げる。

【0025】

【表1】

表1：方法および生産物の望ましい特性

方法の高い安定性

高い衛生基準

発酵穀物の食感の改良

味の改良（使用する穀物固有の味の中和）

栄養（ミネラル）の有効性の改良

フィチン酸濃度の有意な減少（>70%）

キチン／キトサンの形成

エルゴステロール／プロビタミンDの形成

低糖血症指標の維持

生産物の良好な取り扱いおよび保存特性

さらなる使用のための良好な適用性／適合性

【0026】

驚くべきことに全粒からの発酵穀物生産物の製造、特に全粒大麦テンペの製造においてインキュベーション時間が第一の最も重要なパラメーターであることが示された。さらに分離株の選択、浸漬時間、煮沸時間および浸漬工程におけるpH、そしてインキュベーション温度が重要な因子であった。驚くべきことに、接種工程での孢子の濃度はあまり重要ではなかった。これは本発明による改良方法は接種工程における変動に対して固有の安定性を有することを意味するため興味深い知見である。従来から公表されてきた研究に鑑みると、全粒穀物を用いて許容できる生産物が製造できるだけでなく、高品質で多くのさらなる有利な特性を有する生産物が製造できるということも驚くべきことである。

【0027】

穀物は種子穀粒に侵入する生物および表面に付着する生物の両方の大きなマイクロフローラ

50

の宿主である。穀物の最も重要な汚染菌は、例えばコウジカビ属 (*Aspergillus*)、アオカビ属 (*Penicillium*) およびフザリウム属 (*Fusarium*) の種などの菌類である。細菌混入菌の中では枯草菌 (*Bacillus subtilis*) がパンにおける粘着性を引き起こすものとして知られている。本発明者らが行った、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、および大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いた微生物攻撃試験において、本発明の方法は微生物混入に対して固有の耐性を示し、最終生産物には試験において用いた微生物は含まれていないか含まれているとしても非常にわずかであることが判明した。

【0028】

混入の異なる態様を例証するために浸漬前および煮沸後の両方で別々の実験において微生物を添加した。結果は枯草菌 (*B. subtilis*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、および大腸菌 (*E. coli*) のいずれも発酵生産物において生存も成長もしないことを示すものであった。テンペの細菌含量が非常に高いということが広く知られているため、この結果は驚くべきものであり、かつ非常に満足の行くものであった。

【0029】

本発明者らは浸漬時間が非常に重要であることも見出した。それは大麦穀粒の堅さに大きく影響するからである。約4から8時間、好ましくは約5から6.5時間、最も好ましくは約6時間の浸漬時間が発酵全粒穀物生産物、特にテンペ型の大麦発酵生産物の製造に好適であることが見出された。浸漬は従来重要なパラメーターであるとは考えられていなかったのもこの結果は驚くべきものであった。

【0030】

浸漬水の酸性化は望ましくない変質をもたらす細菌の増殖を防ぐことが知られているが、それはクモノスカビ属 (*Rhizopus*) カビは阻害しない。浸漬水の酸性化はダイズテンペの生産について開示されているが文献 (前掲) にはそれは穀物テンペの生産には必要ではないと示されている。しかし本発明者らは驚くべきことに浸漬水の初期 pH を非常に低く、好ましくは約 pH 4 未満にすべきであり、浸漬の継続時間中のわずかな pH の上昇は許容されることを見出した。もっとも好ましくは初期 pH は約 2.5 であり最終 pH は約 3.5 である。

【0031】

本発明の1つの態様によると、酸性化は浸漬工程に用いられる水溶液への好適な酸の添加によって達成される。好適な酸は一般に安全であると認められている酸 (GRAS: acid s generally recognised as safe) であって食品への使用が認められているものである。好適な酸の例としては、酢酸、乳酸およびプロピオン酸が挙げられる。好ましくは乳酸を、好ましくは約 0.7 ~ 1 体積% の濃度で用いる。

【0032】

酸性化はまた、工程の途中、浸漬工程の前に酸生産微生物を添加することによっても達成できる。酸生産微生物には、酢酸生産微生物、乳酸生産微生物およびプロピオン酸生産微生物が含まれる。乳酸生産微生物のグループにはラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*)、ロイコノストック属 (*Leuconostoc*)、ペジオコッカス属 (*Pedococcus*)、およびストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) の微生物が含まれる。これらの微生物はグラム陽性であり、非孢子形成性であり、カタラーゼ陰性であり、発酵性代謝を示し、そして乳酸が糖発酵の間の主要な最終生産物であることを特徴とする。これらはさらに酸耐性で空気耐性の嫌気性菌である。食品生産に用いられ、本発明による使用に即好適な種の例には、ラクトバシラス・アシッドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバシラス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバシラス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバシラス・サンフランシスコ (*Lactobacillus san francisco*) およびラクトバシラス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) が含まれる。残りのグループのロイコノストック属 (*Leuconostoc*)、ペジオコッカス属 (*Pedococcus*)、およびストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) の種も食品生産に有用であり、本発明による方法における使用に適用できる。

10

20

30

40

【0033】

穀物原料の部分的な調理、すなわち煮沸も発酵穀物生産物の製造において重要な役割を果たしていることが知られている。しかし本発明者らは驚くべきことに、短い煮沸時間で十分であり、長すぎる煮沸時間は生産物の品質にとって悪影響を及ぼす結果となることを見出した。煮沸時間は好ましくは約7～15分間の間であり、約10分間の煮沸時間がもっとも好適である。

【0034】

従来の研究は主に煮沸工程だけに關するものであったが、本発明者らは浸漬と煮沸の特定の組み合わせが最終生産物の品質のためにもっとも好ましいことを見出した。長すぎる煮沸時間では、浸漬と煮沸との特定の組合せと同程度の穀粒の弾力性が得られなかった。感覚上の品質（口当たり）にとって非常に重要なこの効果は以前には報告されていない。例えば、大麦穀粒を6時間浸漬し、次いで30分間煮沸した場合、穀粒はデンプンのゼラチン化のために非常に粘り気のあるものとなった。

【0035】

さらに分離株の選択も最終生産物の味と色の両方に影響を及ぼすことが示された。様々な地域に由来する様々なリゾプス・オリゴスポルス (*R. oligosporus*) (ダイズテンペから) の分離株を評価した。表2を参照されたい。分離株はその菌株番号 (JXXX, Dept. of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden) により呼称する。用いたリゾプス・オリゴスポルス (*R. oligosporus*) 分離株の中で、特にJ189、J401、およびJ373が最終生産物の堅さ、香りおよび色の点で良好な特性を示した。

【0036】

【表2】

表2：研究した分離株

菌株番号	受託番号
J189	NRRL 2710
J190	NRRL 5905
J373	CBS 337.62
J374	CBS 339.62
J398	ATCC 48011
J399	ATCC 48012
J400	ATCC 48109
J401	ATTC 64063
J402	ATTC 76011
J403	CBS 228.95

【0037】

穀物はフィチン酸などの、二価カチオンをキレート化し、二価カチオンが人間の腸管において吸収されるのを妨げる抗栄養素を含むことが知られているので、本発明の1つの目的はこの問題に取り組むことである。フィチン酸の濃度を下げ、キレート化されるミネラルの量を最小化してミネラルの取りこみを高めることを可能にすることが望まれた。驚くべきことに本発明ではフィチン酸含量を70%以上下げることが可能となる。

【0038】

本発明者らはインキュベーションは約30～37℃の範囲の温度で行うのが最も好ましいことを見出した。さらにインキュベーション時間が非常に重要であることを見出した。発酵穀物生産物、特に全粒大麦からのテンペ型の発酵生産物の製造のためには、約15～25時間のインキュベーション時間が好ましい。約17～23時間のインキュベーションが最も好ましいと考えられる。

【0039】

菌類の成長は非常に良好で菌糸は生産物全体に均一に分布することが見出された。生産物

は堅く(coherent)、そして取り扱い、例えばスライスしやすい。本発明の生産物はゆで処理または炒め処理などのさらなる処理の間、その形態を保持しており、様々な料理(例えば炒め物料理)における材料として非常に有用である。この結果は全粒穀物の使用に対して報告する従来技術に鑑みると驚くべきものである。

【0040】

本発明の方法により生じる生産物は非常に淡い、くせのない、そして快い味および風味を有する。該生産物はまた、淡くくせのない色を有する。テンペ型の伝統的な生産物にはなかったこれらの両方の因子により、所望の味、風味または色を本発明の生産物に付加することが容易となる。天然または合成の香味料および着色料を、用いる香味料および着色料に応じて、発酵前の穀物原料に、または最終生産物に、あるいは原料と最終生産物の両方に添加することができる。好適な着色料および香味料は、天然の着色料および香味料、塩、スパイスおよび乾燥タマネギなどの、水分除去して乾燥させた、または焼いた野菜である。本発明の1つの態様によると生産物を所望の香味料および着色料を含む水中でゆがく。

10

【0041】

本発明者らはまた、インキュベーション時の穀物集合体を取り巻く気相の相対湿度が重要な役割を果たすことも見出した。これはインキュベーション前の接種された集合体の均一な詰め方の問題に関連する。大規模生産において、インキュベーション時の相対湿度および気体組成、そして周囲気体の循環を制御することが重要となる。

【0042】

本発明者らはまた、接種された穀物混合物を、微生物上の品質を低下させることなく発酵前に冷凍保存できることも見出した。高品質の最終生産物を生産することができただけでなく、驚くべき事に冷凍工程は試験した分離株の大半の孢子形成挙動に対して抑制効果を有していた。

20

【0043】

発酵生産物の冷凍も試みた。驚くべきことに生産物を凍結および解凍してもその構造またはその他の点の品質を損なうことはなかった。この結果は予測されないものであった。というのは、菌糸は凍結において破壊され、望ましくない品質の劣化が起これると思われたからである。

【0044】

また、驚くべきことに本発明の方法では用いた穀物の穀粒構造の保持に成功した。その結果生じる最終生産物は非常に魅力的な口当たりを有し、ミートローフに似た噛み応えであった。

30

【0045】

本発明の方法の衛生上の安定性は非常に高く、本質的に汚染に対して耐性であることが示された。最終生産物はその長い貯蔵寿命から明らかなように高い安定性を示した。本発明の方法によって生産された生産物は3ヶ月以上+8℃で保存することができることが示された。総合的に、工程および生産物の両方の望ましい特性(表1を参照されたい)が本発明の方法/生産物によって達成された。

【実施例】

40

【0046】

1. 工程の条件

1.1 浸漬条件

全部で300gの穀粒(「Gourmetkorn」と呼ぶ精麦および加熱処理した大麦、および「Korngryn」と呼ぶ大麦小粒、両方ともKungssornen, Jarna, Swedenから入手)を500mlの水道水に浸漬した。乳酸を様々な濃度となるように浸漬水に添加した(0.044、0.462および0.88体積%)。浸漬時間1、3.5および6時間について評価した。フラスコを密封し、2℃で放置した。

【0047】

結果の評価により浸漬時間は約4~8時間、好ましくは約5~6.5時間、そして最も好

50

ましくは約6時間であることが示された。乳酸濃度は約0.7～1体積%の範囲が好ましいことが判明した。

【0048】

1. 2 煮沸

浸漬水を切り、穀粒を750mlの、6gの塩(2g/100gの乾燥穀粒)および様々な濃度(0.029、0.3095および0.59%)の乳酸を含有する沸騰水に添加した。穀粒を次いで10、20または30分間煮沸した。

【0049】

結果は用いた条件下では約10分間の煮沸時間が最適であることを示していた。煮沸時間をより長くするとデンプンのゼラチン化が起こってしまう。

【0050】

1. 3 酸性化

煮沸水に乳酸を添加することによって酸性化の効果および酸性pHでの煮沸の結果を評価した。約0.01～0.1体積%の濃度が好ましいことが判明した。

【0051】

2. リゾプス・オリゴスポルス (*R. oligosporus*) 分離株の評価

最初のスクリーニングによりインキュベーション時間と分離株の選択が菌類発酵穀物の生産における2つの最も重要なパラメーターであることが示されたので、本発明者らは、リゾプス・オリゴスポルス (*R. oligosporus*) のその他の分離株が、許容できる最終生産物を生産することができるかを調べることにした。

【0052】

リゾプス・オリゴスポルス (*Rhizopus oligosporus*) の様々な分離株をシリカゲル上で2℃で維持した。これら分離株は、Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Delft, The Netherlands または American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA または Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, IL, USA, から得たものであるが、以後その菌株番号 (JXXX, Dept. of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden) によって称する。(表2を参照されたい)。

【0053】

J189, J190, J373, J374, J398, J399, J400, J401, J402, および J403.

【0054】

2. 1 接種菌の調製

孢子囊孢子懸濁液を得るために、分離株を100ppmのクロラムフェニコール (MEAC, Sigma chemical Co, St Louis, MO) を追加したMalt Extract Agar (MEA, Oxoid, Basingstoke, England) で5～6日間30℃で平板培養(スクリーニング中)または傾斜培養(スクリーニング後)した。生理的食塩水(0.9% NaCl)を追加し、接種ループ(inoculation loop)で掻き取るにより孢子を集めた。孢子懸濁液を取り出し次いで振盪して混合した。懸濁液を2回洗浄し、孢子を次いで所望の濃度となるように生理的食塩水に再懸濁した。

【0055】

懸濁液の濃度は計数チャンバを用いて測定した。生死判別試験をMEACプレート上で時折行って孢子懸濁液の濃度を確認した。

【0056】

2. 2 穀物の発酵

最初の実験により大麦小粒(「Korngryn」)では、高度にゼラチン化し、細菌数も多く、満足の行く結果は得られないことが示された。したがって全粒のみについて研究を続けた。

【0057】

「Gourmetkorn」をモデル系と同様(乳酸溶液(0.88体積%)で6時間浸漬、乳酸溶液(0.029体積%)で10分間煮沸)に浸漬し、煮沸し、水を切って冷却

10

20

30

40

50

したところ、スクリーニングアッセイにおいてすばらしい結果が得られることが判明した。

【0058】

穀粒をこれにしたがって調製し、そしておよそ 1.5×10^4 孢子/g の濃度となるように10種類の分離株を接種した。リゾプス・オリゴスポルス (*R. oligosporus*) の10の分離株すべてを別々にこの研究に使用した。各分離株を接種された穀粒を5つのペトリ皿に詰めた。2つのペトリ皿は30℃でインキュベートし、30時間および40時間放置し、2つのペトリ皿は35℃でインキュベートし20時間および25時間放置した。1つの分離株あたり1つのペトリ皿はインキュベーション前にフリーザーに移した。発酵を停止させた後、ケーキをフリーザーに移した。官能検査の前にすべてのケーキを室温で2時間解凍した。

10

【0059】

スクリーニング研究により、色に関する反応とDG18 (ジクロラングリセロール (*Dichloran Glycerol*) 18%, Oxoid Ltd.) 上のコロニー形成単位は高度に相関していることが示されたので、この研究の結果は、堅さ、匂いおよび色についてのみ試験パネルが評価した。大きなpH変化を起こした分離株があったかを判定するために35℃でインキュベートしたケーキのpHも測定した。10の分離株を用いて接種された穀粒を30℃および35℃で20~40時間インキュベーションした結果、非常に様々な発酵したケーキが生じた。

【0060】

菌糸の生育は驚くべきことに分離株の種類によって異なる傾向にあった。高粘度で弾力性のある菌糸を産生し、時折孢子形成するものもあれば、わずかに酸性臭のするより綿状の菌糸を産生するものもあった。孢子形成は高い着色値によって表された。結果は、匂い、堅さ、色およびpHについて判定した。

20

【0061】

その結果は主に3つのグループに分けられ、1つのグループは許容される生産物(良好)と定義されるものに非常に近かった。35℃で20時間および25時間生育させた分離株J401が評価において最高のスコアを示した。J401はインキュベーションの17時間後に既に良好な生育を示し、25時間後には菌糸は非常に密であり、高度に孢子形成していることはなかった。35℃で生育させた場合は匂いは中程度から非常に良好であり、30℃で生育させた場合にはより酸性気味の匂いを有していた。

30

【0062】

2.3 凍結状態後の発酵

本発明者らは、新たに接種された穀類と同様のケーキを産生するのに十分なほどに孢子が凍結状態後にも生存するのかどうかを知ることにも興味があったため、穀類にすべての分離株の孢子懸濁液を接種し、フリーザー(-18℃)において2週間保存した後にインキュベートした。プレートを5℃で2時間解凍し、次いで35℃で20時間インキュベートした。

【0063】

3つのグループのケーキが確認された。5つの分離株は良好にカビが生育したケーキに分類した(J189, J401, J398, J374 および J400)。4つのケーキはカビの生育がそれほど良好でないケーキに分類した(J190, J373, J402, および J403)、1つの分離株のみについては孢子形成していた(J399)。

40

【0064】

驚くべきことにこの結果は、接種して詰めたすぐ後にケーキをインキュベートした実験において得られた結果と大きく異なっていた。凍結した後にインキュベーションをした場合のケーキにおいては孢子形成はほとんど検出できなかったのに対し、予め凍結せずにインキュベートしたケーキの多くでは孢子形成がさかんであった。J399のみが両方の条件下でほぼ同様の特性を示した。明らかに凍結工程は多くの分離株の孢子形成挙動を遅らせる効果をも有する。

50

【0065】

3. 発酵穀物ケーキの衛生的評価

本発明の方法にしたがって生産した発酵穀物ケーキから、20gを2%ペプトン水 (Oxoid Ltd., UK) 中でストマッカー (Stomacher, Lab Blender Model 400 (BA7021), Seward Medical, London, England) でホモジナイズし、連続希釈法を用いて菌類および細菌の含量を分析した。

【0066】

菌類の成長は、ジクロラン・グリセロール (Dichloran Glycerol) (18%) 寒天基体 (Agar Base) (DG18, Oxoid Ltd., UK) 上で分析した。ジクロランは接合菌 (Zygomycetes) の放射状の成長を抑制し、その他の菌類の存在の検出を可能にする。100 μ l のアリコットをプレートの表面に播き、プレートを25℃で5日間インキュベートした。

【0067】

細菌の総数を、菌類の成長を阻害するためにデルボシド (delvocid) (0.1 g/l) (Gist-brocades, Delft, The Netherlands) を追加したトリプトン・グルコース・エクストラクト・アガー (Tryptone Glucose Extract Agar) (TGEA, Oxoid Ltd., UK) 上で測定した。1ml のアリコットを20ml の培地に混合し、その上層をTGEAで覆い、30℃で72時間インキュベートした。

【0068】

腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) をデルボシド (0.1 g/l) を追加したバイオレット・レッド・バイル・グルコース・アガー (Violet Red Bile Glucose Agar) (VRBG, Oxoid) 上で計数した。1ml のアリコットを20ml の培地と混合し、VRBGで上層を覆い、37℃で24時間インキュベートした。

【0069】

芽胞形成性細菌の量をリインフォースド・クロストリジアル・アガー (Reinforced Clostridial Agar) (RCM, Oxoid Ltd., UK) 上で計数した。栄養細胞を殺すために80℃で13分間熱処理を行い、100 μ l のアリコットをプレートの表面に播いた。クロストリジウム属の種 (*Clostridium* spp.) とバシラス属の種 (*Bacillus* spp.) を識別するためにRCMアガーに、0.0005% ニュートラルレッド (Fluka, LabKemi, Stockholm, Sweden) および0.02% シクロセリン (Sigma, St Louis, USA) を追加した。ニュートラルレッドはpHの指標として作用し、クロストリジウム属の種 (*Clostridium* spp.) が成長すると黄色のゾーンが生じる。また、シクロセリンはバシラス属の種 (*Bacillus* spp.) の成長を阻害する。バシラス (*Bacillus*) の分析用のプレートは37℃で24時間インキュベートし、クロストリジウム (*Clostridium*) 用のプレートは嫌気状態で37℃で72時間インキュベートした。

【0070】

結果は酸性化により最終生産物における細菌の成長が抑制されることを示すものであった。概して、衛生的評価は本発明の方法により衛生上の品質の高い発酵生産物が得られることを示すものであった。これはまた、後述する微生物攻撃試験によっても確認された。

【0071】

4. 衛生的品質：+4℃での保存

本発明の方法によって発酵生産物を生産し、該生産物のケーキを水中で3分間煮沸し、それを直接インキュベーションした。室温で冷却した後、発酵生産物のケーキを清浄なペトリ皿に入れ、+4℃で置いた。ケーキからの試料 (25g) を保存期間中定期的に採取した。試料をさらに (3. 発酵穀物ケーキの衛生的評価 (前述)) に記載のように処理してホモジナイズした。

【0072】

この研究において、細菌の総数、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の量および菌類の成長を測定した。結果を表3に示す。これらを分析する方法は上述のものと同じであった。生産物は驚くべく高度に衛生的安定性を示し、4℃での15週間の保存の間、細菌および菌類の成長は見られなかった。

10

20

30

40

【0073】

【表3】

表3：長期保存中の発酵生産物における微生物含量				
日	細菌の総数 (log cfu/g) 検出限界： 10 ¹ cfu/g	バシラス (Bacillus) (log cfu/g) 検出限界： 10 ² cfu/g	菌類 (log cfu/g) 検出限界： 10 ² cfu/g	pH ¹
0	b. d. ²	b. d.	b. d.	5.5
7	b. d.	b. d.	b. d.	5.7
14	2.9	b. d.	b. d.	5.5
21	b. d.	b. d.	b. d.	5.5
28	b. d.	b. d.	b. d.	5.6
71	b. d.	b. d.	b. d.	5.4
107	b. d.	b. d.	b. d.	5.3

¹ 最初の十倍希釈において測定² b. d. = 検出限界未満

【0074】

新鮮なまたは保存したダイズテンペにおける有害微生物の研究は、Nout et al. (Nout, M. J. R., G. Beernink, et al. (1987). "Growth of *Bacillus cereus* in soyabean tempeh." *Int. J. Food Microbiol.* 4: 293-301)にしたがって行った。結果を比較のために以下に示す(表4)。

【0075】

【表4】

表4：ダイズテンペにおける微生物含量				
	pH	細菌の総数 (log cfu/g)	セレウス菌 (<i>Bacillus cereus</i>) (log cfu/g)	酵母 (log cfu/g)
新鮮なテンペ	6.65	8.43	< 2.7	< 1.7
保存したテンペ (+4℃、 17日間)	n. d. ¹	8.59	< 2.7	< 1.7

¹ 測定せず

【0076】

さらに市販のダイズテンペの微生物品質の調査をオランダにおいて行った。この研究は生産後4週間まで保存した生産物から収集した実際の試料からのデータを示す(表5)。(Samson, R. A., J. A. van Kooij, et al. (1987). "Microbiological quality of commercial tempeh in the Netherlands." *Journal of Food Protection* 50(2): 92-94.)

【0077】

【表5】

表 5 : 様々な量の細菌を含む市販の試料のパーセンテージ

	> 10 ² カウント/g	> 10 ⁵ カウント/g
細菌の総数	100%	98%
セレウス菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	16%	11%
黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	22%	13%

【0078】

セレウス菌 (*Bacillus cereus*) および黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はともに食中毒を起こし得る。この調査では数において試料の約 11% がセレウス菌 (*B. cereus*) を、そして試料の約 13% が黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を含んでいた。これは食中毒の原因となりうる。

【0079】

5. 発酵穀物ケーキの官能試験

経験を積んでいない 5 人のパネルがインキュベーション後の発酵穀物ケーキを評価した。ケーキ (n = 36) を匂い (スケール 1 ~ 5、1 は許容できない匂いに対応し、5 は非常に良好)、堅さ (スケール 1 ~ 5) および色 (スケール 1 ~ 7) について評価した。色はカラースケールを用いて表した。程度 1 の色は成長無しに対応し、3 ~ 5 は許容可能な白っぽい色に対応し、6 ~ 7 は孢子形成したケーキの暗い色に対応する。許容可能なケーキ (高い衛生的品質であって高度に孢子形成はしていないもの、n = 18) を油で揚げてスケール 1 (不良) から 5 (非常に良好) のスケールを用いて味について評価した。

【0080】

発酵穀物ケーキは匂いについては「中程度」から「良好」とみなされることが多く、味に関しては 1 ~ 4 とされることが多く、これは味は一般に色と比べて満足のいくものではなかったことを示す。美味とみなされたケーキ (3.5、4.6、4.0) も生産され、これは本発明の方法の実現可能性を示す。

【0081】

また、本発明の方法によって生産した生産物について優先期間に食品業界で熟練のパネルによる試験を行った。パネルは該生産物に対して味、口当りおよび全体の外観について高い評価を下した。様々な製造業者の研究開発部門におけるさらなる処理手続を伴う実地試験により、該生産物は幅広い料理の材料のための使用に好適であることが示された。発酵全粒生産物は取り扱い性がよく、感覚上の特性を失うことなくスライスしたり刻んだり、ゆでたり焼いたりすることができる。

【0082】

6. 微生物の攻撃

本発明の方法の微生物上の安定性および汚染への耐性を評価するために、選択した微生物を工程中に添加した。この研究に用いた細菌は、孢子形成細菌を代表する枯草菌 (*B. subtilis*)、耐熱性毒素の生産菌として選ばれた黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) および一般的な汚染菌であり食品安全性の指標として用いられることの多いものとして選ばれた大腸菌 (*E. coli*) であった。枯草菌 (*B. subtilis*) 培養物は穀物から単離され、Ann-Sofie Johansson, Kungsörnen AB, Järna, Sweden によって提供された。黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) (SLV-350, ATCC 25923) および大腸菌 (*E. coli*) (SLV-082) は the Swedish National Food Administration, Uppsala, Sweden から提供された参照試料 (2000:1) から単離した。

【0083】

6.1 攻撃微生物の調製

攻撃微生物を選択培地上に維持し、競合する生物のコロニーを 2% ペプトン水溶液に混合した。枯草菌 (*B. subtilis*) 懸濁液を 80℃ で 13 分間熱処理した。適当な培地につい

20

30

40

50

て分析するために連続希釈法を行った。枯草菌 (*B. subtilis*) および大腸菌 (*E. coli*) は 37℃ で 24 時間 インキュベートし、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は 37℃ で 48 時間 インキュベートした。

【0084】

6. 2 浸漬前の攻撃微生物の添加

現実の汚染に見合う量の攻撃微生物を 320 g の大麦 (*gourmet korn*) に添加し、よく混合して添加した生物が大麦に付着する機会を与えるために 30 分間放置した。大麦を 0.88% LAc (KEBO Lab AB, Spanga) を含む水中で 2℃ で 6 時間浸漬した。サンプリング後、大麦の残りの部分を 0.029% LAc (KEBO Lab AB, Spanga) および 750 ml 当たり 6 g の NaCl とともに 10 分間煮沸した。煮沸した大麦を乾燥および冷却 (およそ 40℃ まで) し、リゾプス・オリゴスポルス (*R. oligosporu*) (大麦 1 g あたり 10^5 の孢子) を接種した。接種した混合物をペトリ皿に詰め、35℃ で 20 時間 インキュベートした。

10

【0085】

試料を採取 (a, b, c, d) し、各分析について 20 g を用いた。

(a) 開始レベルの分析用に攻撃微生物の添加後、

(b) 攻撃生物の生存/成長の分析用に浸漬後、

(c) 煮沸中の競合する生物の生存の分析用に煮沸後、

(d) 発酵したケーキについて。

【0086】

20

6. 3 煮沸後の攻撃微生物の添加

上述の方法にしたがって発酵大麦生産物を作った。乾燥および冷却の後、リゾプス・オリゴスポルス (*R. oligosporu*) (大麦 1 g あたり 10^5 の孢子) および攻撃細菌の懸濁液を煮沸した大麦に添加した。ケーキを 35℃ で 20 時間 インキュベートした。

【0087】

試料を採取 (a, b) し、各分析について 20 g を用いた。

(a) 開始値を得るために接種された大麦をサンプリングした。

(b) 発酵したケーキについて。

【0088】

枯草菌 (*B. subtilis*) および大腸菌 (*E. coli*) を前の研究と同様にして計数した。黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は、エッグヨークエマルジョン (Egg Yolk Emulsion) 20% を含有し、デルボシド (delvocid) (0.1 g/l) を追加した Baird-Parker 培地 (Oxoid Ltd., UK) で分析し、37℃ で 48 時間 インキュベートした。

30

【0089】

結果は、発酵生産物において、枯草菌 (*B. subtilis*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、大腸菌 (*E. coli*) のいずれも生存せず、成長しないことを示していた (表 6 および 7)。実際、試験したすべての微生物について生産物における汚染レベルは the Swedish National Food Administration (Guidelines for microbial evaluation of food samples) によって示される閾値よりも有意に低かった。

【0090】

40

【表 6】

表 6 : 攻撃試験 I : 浸漬前に添加した場合の細菌の生存			
	細菌数 (log cfu/g)		
	添加	最終生産物	法定閾値
枯草菌 (<i>B. subtilis</i>)	3.8	b.d. ¹	3 ²
黄色ブドウ球菌 (<i>S. aureus</i>)	4.7	b.d.	2 ³

¹. b.d. < 検出限界 (< 10¹ cfu/g)

². セレウス菌 (*B. cereus*)

³. 凝固酵素陽性スタフィロコシエ (*staphylococcae*)

【0091】

【表7】

表 7 : 攻撃試験 I I : 煮沸後に添加した場合の細菌の生存			
	細菌数 (log cfu/g)		
	添加	最終生産物	法定閾値
枯草菌 (<i>B. subtilis</i>)	3.7	b.d. ¹	3 ²
黄色ブドウ球菌 (<i>S. aureus</i>)	4.8	b.d.	2 ³
大腸菌 (<i>E. coli</i>)	4.0	2.9	3 ⁴

¹. b.d. < 検出限界 (< 10¹ cfu/g)

². セレウス菌 (*B. cereus*)

³. 凝固酵素陽性スタフィロコシエ (*staphylococcae*)

⁴. エンテロバクテリアシアエ (*Enterobacteriaceae*) - 総数

【0092】

結論は、本発明による生産物は高度に衛生的な基準および安定性を示すということである。

【0093】

7. 栄養上の評価

以下に引用する方法にしたがって生産物を分析した。結果を表8に示す。

【表8】

表 8 : 生産物特性			
含有物	煮沸した 大麦	浸漬および煮沸した 大麦	発酵した 大麦
β -グルカン(総量) ¹ (g/100g d.m.)	5.0	4.8	4.3
β -グルカン (可溶性) ¹ (g/100 g d.m.)	2.0	1.6	1.5
β -グルカン (不溶性) ¹ (g/100 g d.m.)	3.0	3.2	2.8
フィチン酸 ² (μ mol/g)	6.5	3.8	2.2
HI*-分析 ³	43		73
予測GI**	45		71

*HI= 加水分解指標 **GI=糖血症指標

【0094】

¹Aman, P, Graham, H (1987). 1987. Analysis of total and insoluble mixed linked (1-3), (1-4)- Beta-D-glucans in barley and oats. Journal of agricultural and food chemistry. 35: 704-709.

【0095】

²Skoglund, E. Carlsson, N.-G. and Sandberg, A.-S. (1997). Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. J. Agric. Food Chem. 45(2):431-436; Skoglund, E. Carlsson, N.-G. and Sandberg, A.-S. (1998). High performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange column. J. agric. Food Chem. 46(5):1877-1882.

【0096】

³Y. Granfeldt, I. Bjorck, A. Drews and J. Tovar. An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. European Journal of Clinical Nutrition (1992) 46, 649-660.

【0097】

本発明を好適な態様について記載してきたが、これは出願時に本発明者らによって知られている最良の態様を構成するものであり、当業者にとって明白な様々な変更および改変を本願の特許請求の範囲に記載する本発明の枠内から逸脱することなく行うことができることが理解されるべきである。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/069738 A1(51) International Patent Classification:
A23L 1/105,
A23B 9/28(74) Agent: HOLMBERG, Martin; Hargenstrikke & Lindvall
AB, P.O. Box 17704, S-118 93 Stockholm (SE).

(21) International Application Number: PCT/SE02/00357

(22) International Filing Date: 28 February 2002 (28.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:
0100704-6 1 March 2001 (01.03.2001) SE(71) Applicant (for all designated States except US): OL-
LIGON AB (SE/SE); Ulmavägen 2B, S-756 51 Uppsala
(SE).(72) Inventors: and
(73) Inventors/Applicants (for US only): BERG, Sofie
(SE/SE); Malms Backe 3A, S-756 47 Uppsala (SE); OL-
SSON, Johan (SE/SE); Södra Tygeln Nättsväg 6, S-755
94 Uppsala (SE); SVANERÖ, Maria (SE/SE); Österå-
gatan 12A, S-753 28 Uppsala (SE); SCHNITZER, Johan
(SE/SE); Stankemögen 6, S-756 47 Uppsala (SE);
ERIKSSON, Anders (SE/SE); Funbo, Åkerby, S-755 97
Uppsala (SE).(81) Designated States (national): AT, AU, AL, AM, AR, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GR, GT,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GM, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW).
European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TD, TM).
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GR,
GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SP, TR). OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/069738 A1

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF FERMENTED CEREAL FOOD PRODUCTS AND PRODUCTS THEREOF

(57) Abstract: An improved method for the production of fermented food products, and in particular fermented cereal products of compact-type using whole grain cereals as raw material, makes it possible to achieve a product of good microbial, nutritional and sensory quality.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

Method for the production of fermented cereal food products and products thereof

5 The present invention relates to improved methods for the production of fermented food products for human consumption, and in particular a fermented cereal food product based on whole grains utilising molds of the *Rhizopus* genus.

Background of the invention

10 The world's population is increasing and the food supply is getting more and more important. Furthermore, the production of food has a considerable negative effect on the environment, especially the waste from the production of animal protein. The loss of energy is also higher when food is produced from animal sources than from cereals. In order to feed a growing population, the countries of the world have to review their present usage of all raw materials potentially suitable for food and convert more of the present animal feed into food for humans.

15 The market for vegetarian food is growing with an increasing speed and the interest in using plant foods as a replacement or a supplement to food from animal sources is becoming more widespread. This is exemplified *inter alia* by the market success observed for the recently introduced mycoprotein products. One objective of the present invention is to make available improved methods for the production of fermented cereal products.

20 In Indonesia, meat is often substituted with tempeh (tempe), a soybean product made through fermentation with a fungus. Tempeh can also be made from other raw material such as beans, peas, wheat etc. Tempeh in Indonesia is often made at home in a small-scale production, while in Holland, Japan, and the USA, large-scale production of soybean tempeh has been implemented. The production of tempeh is however prone to microbial contamination and quality variations. Another objective of the present invention is thus to make available an improved process for the production of fermented food products of tempeh-type.

25 Cereals (Wheat, Barley, Rye, Oats) have excellent nutritional properties. Cereals are often used as animal feed. Wheat and oats are also used e.g. for making breakfast cereals, while wheat flour is used for bakery and bread. Barley is mainly used for beer production. Rye is mostly used for baking bread. One objective of the present invention is to make available novel cereal-based products in order to increase the use of cereals in human food, as to let the

30

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

valuable properties of cereals benefit the consumer. Another objective is to produce cereal-based products exhibiting improved nutritional value, such as improved mineral availability, improved vitamin status and retained low glycaemic index.

Barley (*Hordeum vulgare*) has excellent nutritional properties but is presently mainly used as animal feed. Among barley based products for human consumption, beer constitutes the largest product. In beer however, not all of the valuable properties of barley benefit the consumer. One objective of the present invention is thus to make available novel barley-based products to increase the use of barley in human food. Another objective is to produce barley-based products for human consumption, said products exhibiting improved nutritional value, such as improved mineral availability and improved glycaemic index.

Prior art

More than three decades ago, Hesselstine *et al.* (*New fermented cereal products*, Dev. Ind. Microbiol., 1967, 8, 179-186) showed that fermented tempeh-type products can be prepared from wheat, oats, rye, barley, rice, and combinations of rice or wheat with soybeans, using selected strains of *Rhizopus oligosporus* obtained from Indonesian tempeh fermentation. Cracking of the dehulled seeds was found essential for good growth of the mold. Also barley was tested, in the form of dehulled and cracked seeds, and found to require a boiling time of 12 minutes prior to fermentation. The experiments of Hesselstine *et al.* showed that only certain strains of *Rhizopus* could be used. Those strains which possessed highly active proteolytic and lipolytic enzyme systems, but had little or no amylase activity, turned out to be best suited for the production of cereal tempeh from dehulled and cracked grain.

JP 58158148 A (JP 19820039413 of March 15, 1982) discloses a method of producing fermented food, wherein beans, cereals, and nuts are grinded. Water is added, and the resulting pulp is subjected to a preliminary fermentation, after which the pulp is heated and the pH adjusted to 4.0 - 7.0 by the addition of an acid. Then water is removed until the water content reaches 30 - 65 %, a microorganism belonging to the species *Rhizopus oligosporus* is added, and the pulp fermented at 28 - 34 °C. The product is claimed to be useful in western style cooking and possible to preserve in frozen form.

More recent sources, such as Nowak (*Acta Biotechnol.*, 12 (1992) 4, 345-348) list several problems related to the production of cereal tempeh and recommends the mixing of cereals with legumes to produce good tempeh.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

According to an extensive review article by Hachmeister and Fung (Critical Reviews in Microbiology, 19(3):137-188 (1993)) the use of various cereals for the production of tempeh has been evaluated. Tempeh made from barley, wheat, and rice has been shown to have excellent flavour, texture and aroma. Hachmeister and Fung discuss a possible acid pre-treatment for the purpose of preventing the growth of unwanted microorganisms. It seems however that this was applied to soybeans only, and Hachmeister and Fung state that acidification would not be necessary when using wheat as raw material, indicating that acidification of cereal raw material is not necessary. However, according to the best knowledge of the present inventors, a cereal based product does not seem to have reached the market, which indicates that the practical problems involved have not been overcome.

In the above review, the authors Hachmeister and Fung state that previous attempts to use whole wheat without milling resulted in poor mold growth. It has also been found that tempeh produced from whole grains, including sorghum, wheat, and triticale, lacked patty integrity and was not fit for slicing.

Aiming to develop new fermented cereal products for human consumption, health and safety aspects must be given high priority. Other issues to be considered include the nutritional value of the product, such as the availability of nutrients, the glycaemic index, the microbial content, flavour, texture, and the overall appearance of the product.

A specific aim of the present invention is to make it possible to preserve the structural integrity of the grain, a feature previously considered impossible. It would be very beneficial, in particular from a nutritional point of view, if this could be achieved. It is also necessary to consider the stability and manageability of the process, its economic feasibility as well as other practical or economical issues.

Summary of the invention

The present invention provides a new, improved process for the production of fermented whole grain based cereal products using a *Rhizopus* mold, and in particular novel barley based products of this type. By implementing an improved process as specified in the attached claims, incorporated herein by reference, the present inventors have produced a fermented whole grain based cereal product, and in particular a fermented barley based product, while avoiding or minimising *Rhizopus* sporulation, obtaining an agreeable flavour and texture,

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

good appearance, and microbial safety and stability. Further, the end product is homogeneous and the inventive process exhibited good repeatability and reliability.

Description

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the main crops in Sweden. The growing season is quite short and the resistance to drought, flood and frost is good. Barley has been grown for about 8000 years and it is known in all old cultures.

The barley kernel is harvested with the hull intact. The hull consists of palea and lemma and is strongly attached to the pericarp (fruit coat). The caryopsis consists of pericarp, seed coat, germ and endosperm. The aleurone layer in barley is multiple layered and the endosperm cells are packed with starch embedded in a protein matrix.

When barley is refined for human consumption the husk is removed by dehulling processes. The kernel can then be polished in a process known as pearling, to remove the embryo and the aleurone layer. By varying the degree of pearling the ash content is changed. Dehulled barley can also be processed into barley grits by cutting the kernels to convenient sizes.

Whole grains in this context means grains after at least partial removing of the embryo and the aleurone layer (where applicable), however maintaining the basic geometry and structural integrity of the seed. A whole grain could also be defined as a substantially botanically intact grain, however with the above exception of the removal of the embryo and the aleurone layer (where applicable).

In varieties known as "naked barley" the hull is practically absent, and the steps of dehulling and polishing can be avoided. Thus possible losses of minerals, vitamins, and important dietary fibre components is avoided. There is however an increased risk that the seeds carry microorganisms, the amount of which usually is reduced in the dehulling and polishing steps. These varieties, when used as such or after minor pre-treatment, are also encompassed in the definition "whole grain cereals".

The composition of barley varies due to environment and genotype. The major chemical constituent of the barley kernel is starch, the amount of which varies inversely with protein percentage. Starch content varies between 53-67 percent. The amylopectin content of barley starch is about 74-78 %, leaving about 22-26 % amylose. The protein content is generally between 9-14 %.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

The dietary fibre content of pearled barley is around 16 percent, and the dominating constituents are cellulose, xylan structures, lignin and β -glucans. Dietary fibres are of considerable importance in human food, since the general view is that the intake of fibres can have positive physiological effects, such as reducing blood cholesterol levels. Barley contains

5 a sizeable amount of β -glucans, accounting for approximately 75 % of the endosperm cell wall constituents. In the cell walls, β -glucans are linked to proteins, forming a barrier to the action of proteolytic and amylolytic enzymes.

It is evident for a skilled person that the differences between soybeans, the traditional raw material for tempeh, and barley are considerable. The main constituent of soybeans is protein, while that of barley is starch. Therefore the fungal growth cannot be expected to be similar on these substances. Consequently the present inventors identified large differences in the function between different *R. oligosporus* isolates when applied to the production of cereal tempeh.

10

The present inventors make available an improved process for the production of fermented cereal products from whole grains, and in particular fermented barley based products of tempeh type.

15

Specific objectives for the process and product are listed in Table 1:

Table 1. Desired properties of the process and product

- High stability of the process
- High hygienic standard
- Improved texture of the fermented grains
- Improved taste (neutralisation of the inherent taste of the cereal used)
- Increased availability of nutrients (minerals) .
- Significantly reduced phytic acid concentration (> 70%)
- Formation of chitin / chitosan
- Formation of ergosterol / provitamin D
- Retained low glycaemic index
- Good handling and storage properties of the product
- Good adaptability / compatibility to further use

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

It was surprisingly shown that the incubation time was the single most important parameter in the production of fermented cereal products from whole grain, and in particular in the production of whole grain barley tempeh. Furthermore, the choice of isolate, the soak time, the boil time and the pH in the soaking step were important factors, as well as the incubation temperature. Surprisingly, the concentration of spores in the inoculation step was less important. This is an interesting finding, as it implies that the improved process according to the invention has an inherent stability against variations in the inoculation step. It was also surprising, in light of previous published studies, that it was possible to use whole grain to produce not only an acceptable product, but a product of high quality and having many additional advantageous features.

Cereals are hosts to a large micro-flora, both organisms that invade the seed kernel and organisms that adhere to the surface. The most important contaminants of cereals are fungi, e.g. species of the *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* genera. Among bacterial contaminants, *Bacillus subtilis* is known to cause ropiness in bread. In a microbial challenge test, performed by the present inventors, using *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*, the inventive process was found to exhibit an inherent resistance against microbial contamination and the end product contained no or very few of the microorganisms used in the test.

The microorganisms were added both before soaking, and after boiling, in separate experiments, in order to exemplify different modes of contamination. The results indicated that *B. subtilis*, *S. aureus*, or *E. coli* neither survived nor grew in the fermented product. This is a surprising and highly satisfying result, as it is widely known that the bacterial content of tempeh can be quite high.

The present inventors also found the soaking time to be of considerable importance, as it influenced the consistency of the barley kernel to a large extent. A soaking time in the range of about 4 to 8 hours, preferably about 5 to 6.5 h, and most preferably about 6 h was found to be suitable for the production of a fermented whole grain cereal product, and in particular a fermented barley product of tempeh type. This result was surprising, as soaking has previously not been recognised as an important parameter.

Acidification of the soak water is known to prevent the growth of undesirable spoilage bacteria, yet, it does not inhibit the *Rhizopus* mold. Acidification of the soak water has been

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

disclosed for the production of soybean tempeh, but literature sources (*supra*) indicate that it would not be necessary in the production of cereal tempeh. The present inventors however surprisingly found that the initial pH of the soak water should be very low, preferably below about pH 4, allowing for a slight pH rise during the duration of the soaking. Most preferably, the initial pH is about 2.5 and the end pH about 3.5.

The acidification is achieved, according to one embodiment of the present invention, by the addition of a suitable acid to the aqueous solution used in the soaking step. Suitable acids are acids generally recognised as safe (GRAS) and approved for use in food products. Examples of suitable acids include acetic acid, lactic acid and propionic acid. Preferably lactic acid is used, and preferably at a concentration of about 0.7 – 1 % by volume.

An acidification can also be achieved by the addition of acid producing microorganisms at a point in the process, before the incubation step. Acid producing microorganisms include acetic acid producing microorganisms, lactic acid producing microorganisms and propionic acid producing microorganisms. The group lactic acid producing microorganisms include microorganisms of the genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pedococcus*, and *Streptococcus*. These microorganisms are characterized in that they are Gram positive, non-sporulating, catalase-negative, exhibit a fermentative metabolism and that lactic acid is their major end product during sugar fermentation. They are further acid tolerant and aero tolerant anaerobes. Examples of species used in the production of foods and thus readily suitable for use according to the present invention include *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus san francisco* and *Lactobacillus reuteri*. Also species of the remaining groups or genera *Leuconostoc*, *Pedococcus*, and *Streptococcus* have utility in food production and can be used or adapted for use in a process according to the present invention.

Partial cooking or boiling of the cereal raw material is also known to play a vital role in the production of fermented cereal products. The present inventors however surprisingly found that already a short boiling time was sufficient, whereas prolonged boiling times resulted in negative consequences for the product quality. The boiling time is preferably in the interval of about 7 – 15 minutes, a boiling time of about 10 minutes being most preferred.

Whereas previous studies mostly have involved boiling steps only, the present inventors found a specific combination of soaking and boiling to be most favourable for the quality of

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

the end product. A longer boiling time did not give the same elasticity of the kernel as did the combination of soaking and boiling. This effect, highly important for the sensory quality (mouthfeel), has not been reported earlier. For example, when barley grains were soaked for 6 hours and then boiled for 30 min, the grains became very sticky due to gelatinisation of the starch.

It was further shown, that the choice of isolate influences both taste and colour of the end product. Ten different isolates of *R. oligosporus* (ex soy-tempeh) of different geographic origin were evaluated. See Table 2. The isolates will be referred to by their culture number (JXXX, Dept. of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden). Among the *R. oligosporus* isolates used, especially J189, J401, and J373 exhibited good properties with regard to consistency, smell, and colour of the end product.

Table 2. The studied isolates

Culture No.	Deposit No.
J189	NRRL 2710
J190	NRRL 5905
J373	CBS 337.62
J374	CBS 339.62
J398	ATCC 48011
J399	ATCC 48012
J400	ATCC 48109
J401	ATTC 64063
J402	ATTC 76011
J403	CBS 228.95

As cereals are known to contain anti-nutrients, such as phytic acid, which chelates divalent cations and prevent these from being absorbed in the human intestinal tract, it was one aim of the present invention to address this problem. It was desired to lower the concentration of phytic acid, and thereby make possible a higher uptake of minerals as the amount of chelated minerals is minimised. Surprisingly, the present invention makes it possible to lower the phytic acid content by more than 70 %.

The present inventors have found that the incubation is best carried out at a temperature in the range of about 30 – 37 °C. Further, the incubation time was found to be of considerable importance. For the production of a fermented cereal product, and in particular a fermented whole grain barley based product of tempeh type, an incubation time of about 15 – 25 hours is preferred. An incubation of about 17 – 23 hours is considered most preferred.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

It was found that the fungus growth was very good, and the fungal mycelia evenly distributed in the entire product. The product was coherent and easy to handle, e.g. to slice. The inventive product also retained its shape during further processing, such as boiling or frying, making it very useful as an ingredient in various dishes (e.g. in a stir-fry dish). This result is surprising in light of the prior art advising against the use of whole cereal grains.

The inventive process yields an end product having only a very faint, neutral and pleasant taste and flavour. The product also has a light, neutral colour. Both these factors, not encountered in traditional products of tempeh type, makes it easy to add a desired taste, flavour or colour to the inventive product. Natural or artificial flavouring and colouring agents can be added, either to the cereal raw material before fermentation, or to the end product, or both to the raw material and the end product, depending on the colouring and flavouring agents used. Suitable colouring and flavouring agents are natural colours and flavours, salt, spices and dehydrated, dried or roasted vegetables, such as dry onions etc. According to one embodiment of the invention, the product is blanched in water containing the desired flavouring and colouring agents.

The present inventors have also found that the relative humidity of the gas phase surrounding the cereal mass during incubation plays an important role. This is associated with the question of even packaging of the inoculated mass before incubation. In large scale production, it will be important to control the relative humidity and the gas composition, as well as the circulation of the surrounding atmosphere during incubation.

The present inventors also found, that the inoculated cereal mixture can be deep frozen before fermentation without loss of microbial quality. Not only was it possible to produce an end product of high quality, it was surprisingly found that the freezing step had a retarding effect on the sporulation behaviour of the majority of the isolates tested.

Freezing of the fermented product was also attempted. Surprisingly, the product could be frozen and thawed without damage to its structure or quality in other aspects. This result was unexpected, as fungal mycelia could be expected to be destroyed in the freezing, leading to unwanted deterioration of quality.

It was also surprisingly found, that the inventive process was successful in retaining the grain structure of the cereal used. The resulting end product had a very appealing mouthfeel and gave a chewing resistance resembling that of meatloaf.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

The hygienic stability of the inventive process was shown to be very high and inherently resistant to contaminations. The end products exhibited high stability, as evidenced by their long shelf-life. It was shown that products produced according to the inventive process can be stored at +8 °C for over three months. Overall, the desired properties of both the process and the product (cf. Table 1) were achieved by the inventive process / product.

Examples

1. Process conditions

1.1 Soaking conditions

A total of 300 g grain ("Gourmetkorn" pearled and heat-treated barley, and "Korngryn", barley grits, both from Kungsömen, Järna, Sweden) was soaked in 500 ml of tap water. Lactic acid was added to the soak water to achieve various concentrations: 0.044, 0.462 and 0.88 % by volume. Soaking times of 1, 3.5 and 6 hours were evaluated. The flask was sealed and left at 2°C.

An evaluation of the results showed that the soaking time should be in the range of about 4 to 8 hours, preferably about 5 to 6.5 h, and most preferably about 6 h. A concentration of lactic acid in the range of about 0.7 – 1 % by volume was found advantageous.

1.2 Boiling

The soaking water was drained off and the grains were added to 750 ml of boiling water containing 6 g salt (2 g/100 g of dry grains) and lactic acid at different concentrations: 0.029, 0.3095, and 0.59 %. The grains were then boiled for 10, 20, or 30 min.

The results indicate that a boiling time of about 10 minutes is best suited under the conditions used. A longer boiling time led to gelatinisation of the starch.

1.3 Acidification

The effect of acidification and the consequences of boiling at an acidic pH were evaluated by adding lactic acid to the boiling water. A concentration of about 0.01 – 0.1 % by volume was found to be advantageous.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

2. Evaluation of *R. oligosporus* isolates

Since an initial screening showed that the incubation time and the choice of isolate were the two most important parameters during production of fungal fermented cereal grains, the present inventors wanted to investigate if other isolates of *R. oligosporus* could produce acceptable end product.

Ten different isolates of *Rhizopus oligosporus* were maintained on silica gel at 2°C. The isolates were from Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Delft, The Netherlands or American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA or Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, IL, USA, but are hereinafter referred to by their culture number (JXXX, Dept. of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden) (cf. Table 2):

J189, J190, J373, J374, J398, J399, J400, J401, J402, and J403.

2.1 Preparation of inocula

To obtain sporangiospore suspensions, isolates were grown on Malt Extract Agar (MEA, Oxoid, Basingstoke, England) plates (screening) or slants (after screening) supplemented with 100 ppm chloramphenicol (MEAC, Sigma chemical Co, St Louis, MO) for 5-6 days at 30°C. Spores were harvested by adding physiological salt solution (0.9 % NaCl) and scraping with an inoculation loop. Spore suspensions were removed and then mixed by shaking. Suspensions were washed two times and the spores were then resuspended in physiological salt solution to desired concentrations.

The concentration of the suspensions was determined using a counting chamber. Viability tests were performed occasionally on MEAC plates to confirm the concentration of the spore suspensions.

2.2 Fermentation of cereal grains

Initial experiments showed that the barley grits ("Korngryn") did not give satisfactory results, manifested as a high degree of gelatinization, as well as high bacterial counts. Thus the study was continued with whole grains only.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

"Gourmetkorn" was soaked, boiled, drained and cooled in the same way as a model system [soaking in lactic acid solution (0.88 % by volume) for 6 hours, boiling in lactic acid solution (0.029 % by volume) for 10 minutes], found to give excellent results in a screening assay.

Grains were prepared according to this, and then inoculated with ten different isolates to a concentration of approximately 1.5×10^4 spores / gram. All ten isolates of *R. oligosporus* were used separately in the study. For each isolate, the inoculated grains were packed in five petri dishes. Two plates were incubated at 30°C and left for 30 and 40 h and two plates at 35°C for 20 and 25 h. One petri dish per isolate was transferred to the freezer before incubation. When the fermentation was stopped, the cakes were transferred to the freezer. Before sensory evaluation, all cakes were thawed at room temperature for 2 h.

Since a screening study showed that the responses with relation to colour and colony forming units on DG18 (Dichloran Glycerol 18 %, Oxoid Ltd.) were highly correlated, the results of this study were only evaluated for consistency, odour and colour by a test panel. To determine if any isolate caused great pH changes, the pH of the cakes incubated at 35°C was also measured. Ten isolates were used and the inoculated grains were incubated at 30 and 35°C for 20-40 h, resulting in a wide variety of fermented cakes.

Growth of mycelia tended to be surprisingly different between different isolates. Some produced a thick elastic mycelium, sometimes sporulated, and some produced more cotton-like mycelia with a slightly acid odour. Sporulation was described by a high colour value. Results were determined as odour, consistency, colour and pH.

The results fell into three major groups, where one group comes closest to what was defined as acceptable products (good). Isolate J401 grown at 35°C for 20 and 25 h scored best in the evaluation. J401 showed good growth already after 17 h of incubation and after 25 h the mycelium was very thick and not highly sporulated. The odour was described as neutral to very good when grown at 35°C and when grown at 30°C the odour had a more acid touch.

2.3 Fermentation after freezing conditions

Since the present inventors also had an interest in knowing whether spores survive freezing conditions well enough to produce similar cakes as fresh inoculated grains do, grains were inoculated with spore suspensions of all isolates and incubated after two weeks storage in the freezer (-18°C). Plates were thawed for 2 h at 5°C and then incubated at 35°C for 20 h.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

Three groups of cakes were identified. Five isolates were classified as cakes with good mold growth (J189, J401, J398, J374 and J400). Four cakes were classified as cakes with less good mold growth (J190, J373, J402, and J403) and only one isolate was sporulated (J399).

- 5 Surprisingly, this result differed a lot from the results obtained in trial runs, in which the cakes were incubated immediately after inoculation and packaging. Sporulation was almost not detectable in the cakes after freezing followed by incubation, while sporulation was abundant in many of the cakes incubated without previous freezing. Only J399 exhibited almost identical characteristics under both conditions. Apparently the freezing step has a retarding effect on the sporulation behaviour of most isolates.

10 3. Hygienic evaluation of fermented cereal cakes

From a fermented cereal cake, produced according to the inventive method, 20 g was homogenised in 2 % peptone water (Oxoid Ltd., UK) with a stomacher (Stomacher, Lab Blender Model 400 (BA7021), Seward Medical, London, England) and a serial dilution was used to analyse the content of fungi and bacteria.

- 15 Fungal growth was analysed on Dichloran Glycerol (18 %) Agar Base (DG18, Oxoid Ltd., UK). Dichloran reduces the radial growth of Zygomycetes and makes it possible to detect the presence of other fungi. Aliquots of 100 µl were surface plated and plates were incubated at 25°C for 5 days.

- 20 The total number of bacteria was determined on Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA, Oxoid Ltd., UK) supplemented with delvacid (0.1 g/litre) (Gist-brocades, Delft, The Netherlands) to inhibit fungal growth. Aliquots of 1 ml were mixed with 20 ml media, over layered with TGEA and then incubated at 30°C for 72 h.

- 25 Enterobacteriaceae was enumerated on Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Oxoid) supplemented with delvacid (0.1 g/l). Aliquots of 1 ml were mixed with 20 ml media, over layered with VRBG and then incubated at 37°C for 24 h.

The amount of sporeforming bacteria was enumerated on Reinforced Clostridial Agar (RCM, Oxoid Ltd., UK). Heat-treatment at 80°C for 13 min were performed to kill vegetative cells and then 100 µl aliquots were surface plated. RCM Agar was supplemented with 0.005 % neutral red (Fluka, LabKemí, Stockholm, Sweden) and 0.02 % cycloserine (Sigma, St Louis,

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

USA) to differentiate between *Clostridium* spp. and *Bacillus* spp. Neutral red acts as pH indicator, which gives yellow zones when *Clostridium* spp. grow and cycloserine inhibits growth of *Bacillus* spp. The plates for *Bacillus* analysis were incubated at 37°C for 24 h and *Clostridium* plates were incubated at anaerobic conditions at 37°C for 72 h.

- 5 The results showed that the acidification diminished bacterial growth in the end product. In general, the hygienic evaluation showed that the inventive process produces fermented products of high hygienic quality. This was also confirmed by the microbial challenge test, presented below.

4. Hygienic quality -- storage at +4°C

- 10 The fermented product was produced according to the inventive process, and cakes of said product were boiled in water for 3 minutes, directly following incubation. After cooling in room temperature, cakes of the fermented product were placed in clean petri dishes and placed at +4 °C. Samples (25 gram) from the cakes were taken periodically during the storage time. The samples were further treated and homogenized as described in 3. Hygienic
15 evaluation of fermented cereal cakes (supra).

The total number of bacteria, the amount of *Bacillus subtilis* and fungal growth were measured in this study. The results are shown in Table 3. The methods for analysing them were the same as described above. The product exhibited a surprisingly high degree of hygienic stability, with no growth of bacteria and fungi during 15 weeks of storage at 4 °C.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

Table 3. Content of microorganisms in fermented product during long-term storage

Day	Total number of bacteria (log cfu/g) Detection limit: 10 ³ cfu/g	Bacillus (log cfu/g) Detection limit: 10 ² cfu/g	Fungi (log cfu/g) Detection limit: 10 ² cfu/g	pH ¹
0	b.d. ²	b.d.	b.d.	5.5
7	b.d.	b.d.	b.d.	5.7
14	2.9	b.d.	b.d.	5.5
21	b.d.	b.d.	b.d.	5.5
28	b.d.	b.d.	b.d.	5.6
71	b.d.	b.d.	b.d.	5.4
107	b.d.	b.d.	b.d.	5.3

5 ¹measured in the first decimal dilution

²b.d. = below detection

A study of spoiling microorganism in fresh or stored soybean tempeh was performed of Nout et al. (Nout, M. J. R., G. Beernink, et al. (1987). "Growth of *Bacillus cereus* in soybean tempeh." *Int. J. Food Microbiol.* 4: 293-301). The results are shown below for comparison (Table 4):

10

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

Table 4. Content of microorganisms in soybean tempeh

	pH	Total number of bacteria (log cfu/g)	<i>Bacillus cereus</i> (log cfu/g)	Yeasts (log cfu/g)
Tempeh fresh	6.65	8.43	< 2.7	< 1.7
Tempeh stored (+4 °C, 17 days)	n.d. ¹	8.59	< 2.7	< 1.7

¹not determined

5

Further, a survey of the microbial quality of commercial soybean tempeh was done in the Netherlands. This study shows data (Table 5) from actual samples collected in stores, representing products that been stored up to 4 weeks after production. (Samson, R. A., J. A. van Kooij, *et al.* (1987). "Microbiological quality of commercial tempeh in the Netherlands."

10 *Journal of Food Protection* 50(2): 92-94.)

Table 5. Percentage of commercial samples containing different amounts of bacteria

	More than 10 ² counts/gram	More than 10 ⁵ counts/gram
Total number of bacteria	100%	98%
<i>Bacillus cereus</i>	16%	11%
<i>Staphylococcus aureus</i>	22%	13%

Both *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* can cause food poisoning. In this survey about 11% of the samples contained *B. cereus* and about 13% of the samples contained

15 *S. aureus* in numbers, which may cause food poisoning.

5. Sensory evaluation of fermented cereal cakes

An untrained panel of 5 persons evaluated the fermented cereal cakes after incubation. Cakes (n = 36) were evaluated according to odour (scale 1-5, where 1 corresponds to unacceptable

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

and 5 is very good), consistency (scale 1-5), and colour (scale 1-7). Colour was described by using a colour scale. A colour degree of 1 corresponds to no growth, 3-5 corresponds to acceptable, whitish colours and 6-7 corresponds to the dark colours of sporulated cakes. Acceptable cakes (good hygienic quality and not highly sporulated, n = 18) were fried in oil and evaluated for taste using scale 1 (not good) to 5 (excellent).

The fermented cereal cakes were frequently rated "neutral" to "good" with respect to odour, and 1 - 4 with respect to taste, indicating that the taste was generally less pleasant than the odour. Cakes considered tasty (3.5, 4.6, 4.0) were also produced, indicating the feasibility of the inventive method.

- 10 The products, produced according to the inventive method, were also subjected to tests by skilled panels in food industry during the priority year. The panels gave the product high ratings for taste, mouthfeel and overall appearance. Practical tests involving further processing in the R&D departments of different manufacturers showed that the product was suitable for use as a component of a large range of various dishes. The fermented whole grain
- 15 product exhibited good handling qualities and could be sliced, chopped, boiled and fried without loss of sensory properties.

6. Microbial challenge

- In order to evaluate the microbial stability of the inventive process and its resistance to contamination, selected microorganisms were added during the process. The bacteria used in this study were *B. subtilis*, representing spore-forming bacteria, *S. aureus* chosen as a producer of heat resistant toxin and *E. coli* chosen as a common contaminant and an often used indicator of food safety. The *B. subtilis* culture was isolated from cereals and provided by Ann-Sofie Johansson, Kungsör AB, Järna, Sweden. *S. aureus* (SLV-350, ATCC 25923) and *E. coli* (SLV-082) were isolated from reference samples (2000:1) provided by the
- 20
- 25 Swedish National Food Administration, Uppsala, Sweden.

6.1 Preparation of the challenge microorganisms

The challenge microorganisms were maintained on selective medium and colonies of the competing organism were mixed with 2 % peptone water. *B. subtilis* suspension was heat treated at 80 °C for 13 min. A serial dilution was done for analyses on an appropriate

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

medium. *B. subtilis* and *E. coli* were incubated at 37 °C for 24 h, while *S. aureus* was incubated at 37 °C for 48 h.

6.2 Addition of the challenge microorganisms before soaking

- The challenge microorganisms was added to 320 g barley (gourmetkorn) in amounts proportional to realistic contamination, well mixed and rested for 30 min to give the added organisms a chance to adhere to the barley. The barley was soaked in water with 0.88% LAc (KEBO Lab AB, Spånga) at 2 °C for 6 h. After sampling, the remaining part of the barley was boiled for 10 min with 0.029 % LAc (KEBO Lab AB, Spånga) and 6 g NaCl per 750 ml. The boiled barley was dried and cooled (to approx. 40 °C) and *R. oligosporus* (10^5 spores/ gram barley) was inoculated. The inoculated mixture was packed in petri dishes and incubated at 35 °C for 20 h.

Samples were taken (a, b, c, d) and for each analysis 20 g was used.

- (a) After addition of challenge organisms for analysing the start levels
- (b) After soaking for analysing the survival/ growth of the challenge organism
- 15 (c) After boiling to analyse the survival of the competing organism during boiling
- (d) On the fermented cake

6.3 Addition of the challenge microorganisms after boiling

- A fermented barley product was made according to the above-mentioned recipe. After drying and cooling a suspension of *R. oligosporus* (10^5 spores/ gram barley) and the challenge bacteria were added to the boiled barley. The cakes were incubated at 35 °C for 20 h.

Samples were taken (a, b) and for each analysis 20 g was used.

- (a) Inoculated barley was sampled to get a start value
- (b) On the fermented cake

- B. subtilis* and *E. coli* were enumerated the same way as in the prestudies. *S. aureus* was analysed on Baird-Parker medium (Oxoid Ltd., UK) with Egg Yolk Emulsion 20 %, supplemented with delvacid (0.1g/liter) and incubated at 37 °C for 48 h.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

The results showed that *B. subtilis*, *S. aureus*, or *E. coli* neither survived nor grew in the fermented product (Tables 6 and 7). In fact, for all tested microorganisms, the level of contamination in the products were significantly lower than the threshold values set by the Swedish National Food Administration (Guidelines for microbial evaluation of food samples):

5 Table 6: Challenge test I: Survival of bacteria, when added before soaking

	Bacterial counts (log cfu/g)		
	Addition	End product	Legal threshold values
<i>B. subtilis</i>	3.9	b.d. ¹	3 ²
<i>S. aureus</i>	4.7	b.d.	2 ³

¹ b.d. below detection limit (less than 10² cfu/g)

² *B. cereus*

10 ³ Coagulase positive staphylococci

Table 7: Challenge test II: Survival of bacteria, when added after boiling

	Bacterial counts (log cfu/g)		
	Addition	End product	Legal threshold values
<i>B. subtilis</i>	3.7	b.d. ¹	3 ²
<i>S. aureus</i>	4.8	b.d.	2 ³
<i>E. coli</i>	4.0	2.9	3 ⁴

15 ¹ b.d. below detection limit (less than 10² cfu/g)

² *B. cereus*

³ Coagulase positive staphylococci

⁴ Enterobacteriaceae - total count

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

The conclusion is that the inventive product exhibits high hygienic standard and stability.

7. Nutritional evaluation

The product was analysed according to the below referenced methods. The results are shown in Table 8.

Table 8. Product properties

Content	Bolled barley	Soaked and bolled barley	Fermented barley
β -glucans (total) ¹ (g/100g d.m.)	5.0	4.8	4.3
β -glucans (soluble) ¹ (g/100 g d.m.)	2.0	1.6	1.5
β -glucans (insoluble) ¹ (g/100 g d.m.)	3.0	3.2	2.8
Phytic acid ² (μ mol/g)	6.5	3.8	2.2
HI*-analysis ²	43		73
Predicted GI**	45		71

* HI= hydrolysis index ** GI= glycaemic index

¹ Aman, P, Graham, H (1987). 1987. Analysis of total and insoluble mixed linked (1-3),(1-4)- Beta-D-glucans in barley and oats. Journal of agricultural and food chemistry. 35: 704-709.

² Skoghund, E. Carlsson, N.-G. and Sandberg, A.-S. (1997). Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. J. Agric. Food Chem. 45(2):431-436; Skoghund, E. Carlsson, N.-G. and Sandberg, A.-S. (1998). High performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on stron amion exchange columns. J. agric. Food Chem. 46(5):1877-1882.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

³ Y. Granfeldt, L. Björck, A. Drews and J. Tovar. An *in vitro* procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products, European Journal of Clinical Nutrition (1992) 46, 649-660.

5 Although the invention has been described with regard to its preferred embodiments, which constitute the best mode presently known to the inventors, it should be understood that various changes and modifications as would be obvious to one having the ordinary skill in this art may be made without departing from the scope of the invention as set forth in the claims appended hereto.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

Claims

1. Method for the production of a fermented food product based on whole grain cereal raw material with minimal surface alterations, comprising the following steps:
 - soaking the whole grain cereal raw material in an aqueous solution,
- 5 - heat treating the whole grain cereal raw material in an aqueous medium,
- acidification of the whole grain cereal raw material,
- inoculation with a fungus of the *Rhizopus* genus, and
- incubation of the inoculated whole grain cereal raw material.
2. Method according to claim 1, characterized in that the acidification consists of the
- 10 addition of an organic acid to the aqueous solution used for the soaking of the cereal raw material.
3. Method according to claim 1, characterized in that the acidification consists of the addition of acid producing bacteria chosen from the group consisting of acetic acid producing bacteria, lactic acid producing bacteria and propionic acid producing bacteria
- 15 4. Method according to claim 1, characterized in that the aqueous solution used for soaking the cereal raw material has an initial pH of about pH 2.5.
5. Method according to claim 1, characterized in that the soaking time is in the interval of about 4 to about 8 h.
6. Method according to claim 1, characterized in that the heat treatment time is in the
- 20 interval of about 5 to about 10 min.
7. Method according to claim 1, characterized in that the cereal raw material consists substantially of barley (*Hordeum vulgare*) in the form of whole grains.
8. Method according to claim 1, characterized in that the fungus of the *Rhizopus* genus is *Rhizopus oligosporus*.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

9. Method according to claim 1, characterized in that the fungus of the *Rhizopus* genus is chosen among the *Rhizopus oligosporus* isolates J189 (NRRL 2710), J373 (CBS 337.62), and J401 (ATTC 64063).
10. Method according to claim 1, characterized in that the fungus of the *Rhizopus* genus is the *Rhizopus oligosporus* isolate J401 (ATTC 64063).
11. Method according to claim 1, characterized in that the incubation is performed at a temperature in the interval of 30°C up to and including 37°C.
12. Method according to claim 1, characterized in that the inoculated whole grain cereal raw material is deep-frozen and thawed before fermentation.
- 10 13. Method according to claim 1, characterized in that the fermented product is boiled or blanched in an aqueous solution after completion of the incubation.
14. Method according to claim 1, characterized in that the fermented product is deep-frozen after completion of the incubation.
- 15 15. Method according to claim 13, characterized in that colouring and flavouring agents are added to the aqueous solution used for boiling or blanching the incubated product.
16. A fermented food product comprising whole cereal grains and a fungus of the *Rhizopus* genus.
17. A fermented food product according to claim 16, characterized in that the whole cereal grains mainly consist of barley (*Hordeum vulgare*).
- 20 18. A fermented food product according to claim 16, characterized in that the fungus of the *Rhizopus* genus is chosen among the *Rhizopus oligosporus* isolates J189 (NRRL 2710), J373 (CBS 337.62), and J401 (ATTC 64063).
19. A fermented food product according to claim 18, characterized in that the fungus of the *Rhizopus* genus is the *Rhizopus oligosporus* isolate J401 (ATTC 64063).
- 25 20. A fermented food product comprising whole grain cereals and a fungus of the *Rhizopus* genus, characterized in that the phytic acid content of the cereals is reduced by at least 70 % compared to the phytic acid content of the unprocessed cereals.

WO 02/069738

PCT/SE02/00357

21. A fermented food product produced by the method according to any one of claims 1 - 15.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/00357
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: A23L 1/105, A23B 9/28 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: A23B, A23L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 58158148 A (TORIKOSHI SEIFUN KK) 1983-09-20 (abstract) World Patents Index (online). London, U.K.: Derwent Publications, Ltd. (retrieved on 2002-05-30). Retrieved from: EPO WPI Database. DM198343. Accession No. 1983-798890	1-21
Y	Kathleen A. Hachmeister et al, "Tempeh: A Mold-Modified Indigenous Fermented Food Made from Soybeans and/or Cereal Grains" Critical Reviews in Microbiology, 19(3):137-188 (1993) see pages 172 - 182	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" documents which carry a cross-reference to priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later documents published after the international filing date or priority date and not to conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
31 May 2002		19-06-2002
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Inger Löfgren/mj Telephone No. +46 8 782 23 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 02/00357

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 3905055 A1 (PETER ECKES KG MBH), 23 August 1990 (23.08.90), page 3, line 39 - line 42; page 3, line 61 - line 63; page 4, line 17 - line 19, page 4, line 31 - line 38 --	1-21
A	RU 2095006 C1 (RYABINKINA O A) 1997-09-30 (abstract) World Patent Index (online). London, U.K.: Derwent Publications, Ltd. (retrieved on 2002-05-30) Retrieved from: EPO WPI database. DW 199828, Accession No. 1998-320335 --	1-21
A	RU 2086153 C1 (RYABINKINA O A) 1997-08-10 (abstract) World Patents Index (online). London, U.K.: Derwent Publications, Ltd. (retrieved on 2002-05-30). retrieved from: EPO WPI database. DW199815, Accession No. 1998-167581 --	1-21
A	WO 9117672 A1 (SALOVAARA, HANNU), 28 November 1991 (28.11.91) --	1-21
A	DE 2848699 A1 (MACLENNAN, MARY ELISABETH), 22 May 1980 (22.05.80) ----- -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No. PCT/SE 02/00357	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
DE	3905055 A1	23/08/90	NONE		
WO	9117672 A1	28/11/91	AT 147591 T AU 7870291 A DE 69124267 D,T DK 568530 T EP 0568530 A,B SE 0568530 T3 ES 2098355 T FI 88856 B,C FI 902464 A	15/02/97 10/12/91 14/08/97 16/06/97 10/11/93 01/05/97 15/04/93 19/11/91	
DE	2848599 A1	22/05/80	NONE		

フロントページの続き

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ソフィー・バリィ

スウェーデン、エス-7 5 3 1 9 ウブサラ、ベヴァーンス・グレント 1 8 アー番

(72) 発明者 ヨハン・オルソン

スウェーデン、エス-7 5 5 9 1 ウブサラ、バリンクスタ・フレヴィ 5 番

(72) 発明者 マリア・スヴァンバリィ

スウェーデン、エス-7 5 3 2 8 ウブサラ、エステレンクスガータン 1 2 アー番

(72) 発明者 ヨハン・シュニャーラー

スウェーデン、エス-7 5 6 4 7 ウブサラ、スタヴカーンヴェーゲン 6 番

(72) 発明者 アンデッシュ・エリクソン

スウェーデン、エス-7 5 5 9 7 オカービー、フンボ

Fターム(参考) 4B018 MD09 MD49 MD80 ME14 MF13

4B023 LC09 LE30 LG05 LK04 LK18 LP16